

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu Dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan pada bulan Ferbuari-Juni 2025 di Laboratorium Bahan Alam, Laboratorium Kimia Farmasi, dan Laboratorium Instrumen Farmasi Program Studi S1 Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Bhamada Slawi.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah Spektrofotometri UV-Vis (Shimadzu UV 2450), Spektroskopi IR (Alpha), mortar, timbangan analitik (HWH DJ 203 A), kompor listrik, oven, tanur, loyang, toples kaca, pH meter, termometer, alat-alat gelas yang digunakan adalah labu ukur (*pyrex*), gelas ukur (*pyrex*), beaker glass (*pyrex*), erlenmeyer (*pyrex*), tabung reaksi (*pyrex*), rak tabung reaksi, cawan porselen, corong kaca, pipet tetes, batang pengaduk, kuvet disposable, mikro pipet, kain blacu, kertas saring, dan aluminium foil.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu kulit ikan lele, tulang ikan lele, larutan HCl 3%, gelatin standar, CBB (*Comassing Brillint Blue*) G-250, larutan etanol 95%, larutan asam Fosfat 85%, dan aquadest.

3.3 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini yaitu menggunakan penelitian eksperimental.

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah kulit dan tulang ikan lele (*Clarias batrachus*).

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah penentuan kadar isolat gelatin pada kulit dan tulang ikan lele (*Clarias batrachus*).

3.3.3 Variabel Kontrol

Variabel kontrol yang digunakan pada penelitian ini adalah lokasi pengambilan ikan lele, isolasi gelatin, metode Spektrofotometri UV-Vis, dan metode Spektrofotometer FTIR.

3.4 Prosedur Penelitian

Untuk mencapai tujuan penelitian ini, peneliti terlibat dalam sejumlah tindakan secara konsisten. Adapun tahapan prosedur penelitian ini meliputi:

3.4.1 Determinasi Hewan

Untuk melakukan determinasi hewan dilakukan di Laboratorium Farmakologi Prodi Farmasi-S1 Universitas Bhamada Slawi. Determinasi memiliki tujuan agar memastikan keaslian dan kebenaran identitas dari hewan serta untuk menghindari kesalahan dalam pemilihan hewan yang digunakan.

3.4.2 Isolasi Gelatin

Isolasi gelatin meliputi 4 tahap yaitu *degreasing*, *demineralisasi*, ekstraksi, dan pengeringan.

1. Preparasi Sampel

Ikan lele yang akan digunakan sebanyak 9 kg untuk menghasilkan kulit dan tulang ikan sebanyak 200 gram. Lokasi pengambilan ikan lele diperoleh dari tempat budidaya ikan lele Desa Kedung Banteng, Kecamatan Kedung Banteng, Kabupaten Tegal. Kulit dan tulang ikan lele dipisahkan dari sisa-sisa daging dari pemfiletan, dibersihkan, dan selanjutnya dilakukan proses *degreasing* (Moranda, Handayani, dan Nazlia, 2018).

2. *Degreasing*

Proses *degreasing* (proses untuk menghilangkan komponen non kolagen dari bahan baku). Kulit dan tulang ikan lele direndam menggunakan air panas dengan suhu 60-70°C selama 1-2 menit agar sisa-sisa daging dan lemak maupun kotoran lainnya yang menempel dapat di hilangkan. Setelah itu ditiriskan dan ditimbang masing-masing sebanyak 200 gram sampel. Pada sampel kulit ikan dipotong dengan ukuran 2x2 cm, sedangkan tulang ikan dipotong dengan ukuran 2 cm. Kemudian kulit dan tulang ikan yang telah dipotong-potong dicuci dengan air mengalir dan ditiriskan kembali, Lalu dilanjutkan dengan proses *demineralisasi* gelatin dengan

menggunakan larutan asam (Moranda, Handayani, dan Nazlia., 2018).

3. *Demineralisasi*

Proses *demineralisasi* (proses untuk menghilangkan kalsium dan garam mineral dari bahan baku) dilakukan dengan merendam kulit dan tulang ikan lele masing-masing yang sudah ditimbang 200 gram sampel, pada sampel kulit ikan lele di rendam dengan larutan HCl 3% selama 12 jam, sedangkan sampel tulang ikan lele di rendam dengan larutan HCl 3% selama 24 jam dimasukkan ke dalam toples kaca yang berbeda dengan perbandingan sampel dengan larutan HCl adalah (1:2) sampai terbentuk *ossein* (tulang/kulit menjadi lunak). Setelah itu, kulit dan tulang ikan lele dicuci dengan menggunakan air mengalir sampai pH menjadi netral (6-7). Kemudian *ossein* yang sudah netral ditiriskan dan dilakukan ekstraksi (Moranda, Handayani, dan Nazlia., 2018).

4. Ekstraksi

Ekstraksi gelatin dilakukan dengan menggunakan sampel yang telah terbentuk *ossein*, kemudian ditambahkan 400 mL aquadest dimasukkan ke dalam gelas *beaker* yang berbeda. Kemudian kulit dan tulang ikan lele diekstraksi dalam *waterbath* pada suhu 60°C selama 5 jam. Hasil ekstrak kulit dan tulang ikan lele disaring dengan menggunakan kain blacu dan kertas saring agar diperoleh larutan filtrat. Kemudian hasil filtrat ditampung ke dalam

gelas *beaker* selanjutnya dilakukan proses pengeringan (Moranda, Handayani, dan Nazlia., 2018).

5. Pengeringan

Filtrat yang diperoleh dari proses ekstraksi kemudian dimasukkan ke dalam tempat loyang, lalu dioven pada suhu 60°C selama 48 jam (sampai diperoleh lapisan gelatin). Lapisan gelatin kering yang terbentuk di permukaan loyang diambil, kemudian di haluskan menggunakan mortir sehingga diperoleh gelatin serbuk kering. Setelah itu, sampel ditimbang untuk melihat rendemen. (Moranda, Handayani, dan Nazlia., 2018).

3.4.3 Uji Kualitas Gelatin Kulit Dan Tulang Ikan Lele (*Clarias batrachus*).

a. Rendemen

Perhitungan rendemen gelatin dilakukan dengan menghitung perbandingan berat gelatin kering terhadap berat bahan baku sebelum ekstraksi gelatin. Menurut Kholis, Luketsi, dan Mubarak., (2023) dengan rumus perhitungan rendemen yaitu:

$$\text{Rendemen gelatin (\%)} = \frac{\text{Berat gelatin kering (g)}}{\text{Berat bahan baku (g)}} \times 100\%$$

b. Uji Organoleptik

Sampel gelatin diamati secara langsung pada gelatin kulit dan tulang ikan lele meliputi warna, bentuk, dan aroma yang dihasilkan (Arziyah, Yusmita, dan Wijayanti 2022).

c. Uji Kadar Air

Sampel gelatin ditimbang sebanyak 0,5 gram di letakkan ke dalam cawan kosong yang sudah ditimbang beratnya, cawan kosong yang sebelumnya sudah dikeringkan di dalam oven, lalu didinginkan ke dalam desikator selama 15 menit. Cawan yang berisi sampel gelatin kemudian dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 105°C selama 3 jam. Cawan tersebut lalu didinginkan di dalam desikator selama 15 menit dan setelah dingin cawan ditimbang. Menurut Mauliddiyah., (2021) Kadar air dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar Air (\%)} = \frac{W_1 - W_2}{\text{Bobot Sampel}} \times 100\%$$

Keterangan:

W1 = berat (sampel + cawan) sebelum dikeringkan

W2 = berat (sampel + cawan) setelah dikeringkan

d. Uji Kadar Abu

Penentuan kadar abu dilakukan dengan cara krus dikeringkan terlebih dahulu ke dalam tanur selama 30 menit, selanjutnya dimasukkan ke dalam desikator selama 30 menit dan ditimbang berat krus tersebut. Sampel gelatin ditimbang sebanyak 1 gram di masukkan ke dalam krus, lalu dimasukkan ke dalam tanur selama 3 jam dengan suhu 600°C. Setelah gelatin menjadi abu kemudian didinginkan ke dalam desikator selama 30 menit dan ditimbang hingga berat konstan. setelah itu dihitung kadar abu menurut Hasan dan Dwijayanti., (2022) dengan rumus:

$$\text{Kadar Abu (\%)} = \frac{\text{Berat Abu (gram)}}{\text{Berat Sampel Awal (gram)}} \times 100\%$$

e. Uji Derajat Keasaman (pH)

Sampel gelatin ditimbang sebanyak 0,2 gram dilarutkan ke dalam aquadest sebanyak 20 mL pada suhu 25°C dan diaduk hingga homogen, kemudian diukur derajat keasamannya (pH) dengan menggunakan pH meter (Prihatiningsih, Puspawati, dan Sibarani., 2014).

3.4.4 Analisis Spektrofotometri UV-Vis

1. Pembuatan Reagen *Bradford*

Ditimbang CBB (*Coomassie Brilliant Blue*) G-250 sebanyak 25 mg dilarutkan dalam 12,5 mL Etanol pa 95%. Setelah itu ditambahkan larutan asam Fosfat 85% sebanyak 25 mL. Semua bahan tersebut di campurkan kemudian ditambah aquadest hingga tanda batas labu ukur 250 mL, lalu disaring dengan kertas saring. 250 mL reagen *bradford* tersebut merupakan stok pekat untuk 5 kali pengenceran, reagen *bradford* dibuat pekat untuk menghindari oksidasi. Pembuatan reagen *bradford* dengan 5 kali pengenceran adalah sebanyak 40 mL stok reagen *bradford* diambil, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 200 mL dan ditambahkan aquadest sampai tanda batas, lalu simpan larutan dalam botol coklat (Hadinoto dan Syukroni., 2019).

2. Pembuatan Larutan Standar gelatin 100 ppm

Disiapkan 10 mg gelatin, dilarutkan dengan aquadest steril di dalam gelas beaker sampai larut, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL. Sehingga diperoleh larutan stok gelatin pada konsentrasi 1000 ppm. Larutan standar pada konsentrasi 1000 ppm dipipet sebanyak 1 mL, dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan aquadest steril sampai tanda batas dan dihomogenkan. Di dapat larutan standar gelatin dengan konsentrasi 100 ppm (Masri, 2013).

3. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Diambil dari larutan konsentrasi 40 ppm dipipet sebesar 0,1 mL dan ditambah 5 mL reagen *Bradford*. Kemudian digojog sampai homogen, lalu di diamkan pada suhu ruang selama 10 menit. Setelah itu dimasukkan ke dalam kuvet dan diukur serapannya dengan Spektrofotometri UV-Vis dengan rentang panjang gelombang 400-800 nm (Tuslinah dkk., 2022).

4. Pembuatan Larutan Kurva Kalibrasi

Disiapkan 7 tabung reaksi, diambil larutan standar dan dibuat konsentrasi 10 ppm; 20 ppm; 30 ppm; 40 ppm; 50 ppm; 60 ppm; dan 70 ppm, sehingga didapat larutan sebanyak 0,5 mL, 1 mL, 1,5 mL, 2 mL, 2,5 mL, 3 mL, 3,5 mL, masing-masing larutan dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL. Kemudian ditambahkan aquadest hingga tanda batas, dan digojog sampai homogen. Selanjutnya diambil 0,1

mL dari masing-masing konsentrasi larutan yang telah dibuat kemudian ditambah 5 mL reagen *Bradford* dan digojog sampai homogen, lalu di diamkan pada suhu ruang selama 10 menit agar terjadi reaksi antara reagen dengan protein. Absorbansi diukur dengan panjang gelombang maksimum yang diperoleh, kemudian dibuat kurva kalibrasinya (Tuslinah dkk., 2022).

5. Penentuan Kadar Gelatin

Sampel gelatin yang diperoleh dari kulit dan tulang ikan lele masing-masing ditimbang sebanyak 50 mg kemudian dilarutkan dalam 10 mL aquadest pada suhu 60-70°C, lalu dipipet larutan gelatin sebanyak 0,1 mL dan ditambah 5 mL reagen *Bradford* dan digojog sampai homogen, lalu di diamkan pada suhu ruang selama 10 menit agar terjadi reaksi antara reagen dengan protein. kemudian dilakukan pengukuran dengan menggunakan Spektrofotometri UV-Vis. Absorbansi yang diperoleh lalu dibaca dan dihitung kadarnya dengan persamaan $y = bx + a$ dari hasil kurva kalibrasi larutan gelatin standar (Tuslinah dkk., 2022).

3.4.5 Analisis Spektrofotometer FTIR

Analisis FTIR digunakan untuk mengetahui gugus fungsi khas dari gelatin. Sampel gelatin yang digunakan adalah serbuk gelatin yang telah dihaluskan sebelumnya. Lalu sampel dimasukkan ke dalam alat Spektrofotometer FTIR, setelah itu sampel gelatin tersebut akan terbaca

pada *output* data instrumen FTIR (Mahmuda, Idiawati, dan Wibowo., 2018).

3.5 Analisis Data

Analisis data yang diperoleh dalam penelitian ini adalah rendemen, organoleptik, kadar air, kadar abu, derajat keasaman (pH), Spektrofotometer dan FTIR. Data yang dihasilkan di atas dilakukan analisis deskriptif yang disajikan dalam bentuk tabel. Sedangkan analisis data yang diperoleh dari Spektrofotometri *UV-Vis* dilakukan untuk menentukan kadar isolat gelatin yang dihasilkan dari kulit dan tulang ikan lele (*Clarias batrachus*). Data kadar isolat gelatin dianalisis menggunakan Uji-T Independent untuk membandingkan rata-rata kadar isolat gelatin antara kulit dan tulang ikan lele, sebelum dilakukan uji T adalah uji normalitas data menggunakan uji *Levene's test* dengan menggunakan fasilitas program SPSS.